

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-84529

(43) 公開日 平成9年(1997)3月31日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 K 1/16	3 0 4		A 2 3 K 1/16	3 0 4 B
A 6 1 K 35/72	A D Z		A 6 1 K 35/72	A D Z

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平7-272144

(22) 出願日 平成7年(1995)9月27日

(71) 出願人 000142252

株式会社興人

東京都中央区日本橋室町4丁目1番21号

(72) 発明者 藤井 裕志

大分県佐伯市野岡町1丁目1-24-105

(72) 発明者 新井 修

千葉県流山市名都借438 ダイアパレスラ  
イトガーデン南柏307

(72) 発明者 美矢 豊文

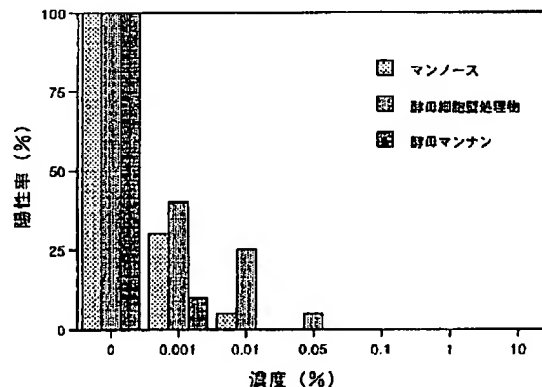
大分県佐伯市宇女島6952番地3

(54) 【発明の名称】 微生物由来のマンナンを含む家畜および家禽用飼料

(57) 【要約】

【目的】 家畜あるいは家禽の食欲を阻害することなく、食中毒の原因となる有害な腸内細菌を選択的に体外に排除する方法を提供する。

【構成】 微生物由来のマンナン、酵母細胞壁が0.001~10重量%含有する飼料を摂取させることにより、グラム陰性細菌を選択的に体外に排出させる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 家畜及び家禽に微生物由来のマンナン及び／又は細胞壁を摂取させることを特徴とする、有害な腸内細菌を選択的に体外に排出させる方法。

【請求項2】 有害な腸内細菌を選択的に体外に排出する機能を有する微生物由来のマンナン及び／又は細胞壁を0.001～10重量%含む家畜および家禽用飼料。

【請求項3】 微生物が酵母である請求項2記載の家畜及び家禽用飼料。

【請求項4】 有害な腸内細菌がグラム陰性細菌である請求項2および3記載の家畜及び家禽用飼料。

【請求項5】 グラム陰性細菌がサルモネラ、大腸菌である請求項2～4記載の家畜及び家禽用飼料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、食中毒原因菌を含まない安全な畜産物を提供することおよび家畜及び家禽の健康維持を目的とした、有害な家畜・家禽の腸内細菌を腸より排出させる方法及び該作用を有する飼料に関する。

## 【0002】

【従来の技術】畜産物による食中毒は、家畜・家禽の飼育・と畜処理・流通・加工のいずれかの過程で原因微生物に汚染されて生じる。これらの中でも特に飼育段階で家畜・家禽が原因微生物の汚染された場合、それ以後の過程で他の汚染されていない畜肉に広がる恐れがある。また、鶏卵など畜肉以外の畜産物でも、微生物に汚染された家畜・家禽から生産されるものは、微生物に汚染されている割合が高い。食中毒の予防は流通・加工段階も含めて全体で対応しなければならない問題ではあるが、家畜・家禽の飼育時から微生物汚染を防ぐことが最も重要である。家畜及び家禽の飼育中の微生物の主な汚染源としては、飼料、飲水、敷き料などがある。特に飼料、水などから経口的に摂取された有害細菌の中には腸内に定着するものもあり、と畜時に畜肉へ汚染し流通中に増殖して食中毒を引き起こすことが指摘されている。また、有害細菌の腸への定着と繁殖は家畜及び家禽の腸内細菌叢を崩し、家畜の健康を損ねて生産者にも多大な経済的損失を与えることとなる。そのため、飼料・水の細菌対策は消費者のみならず生産者にも非常に重要な問題である。そこで飼料を熱処理などにより殺菌することが試みられているが、有効成分の損失や処理コストが高いことが問題となり、一部でしか用いられていない。

【0003】飼育中に起こる細菌汚染の予防には飼料の管理だけでは不十分で、畜舎全体としての衛生管理が求められており、即時に対応することは難しい。また、有害細菌摂取後にその腸内での繁殖を防ぐ方法として抗生物質を用いることがあるが、耐性菌の出現及び薬剤の畜産物への残留性が問題となり、人体への影響を考えると好ましい方法とはいえない。

【0004】より安全に有害細菌の腸内での繁殖を防ぐ

方法として、ヌルミ法が開発されている。腸内細菌叢の完成していない幼若齢の雛はサルモネラに感受性が高いが、成鶏の腸管内容物を投与して先に成鶏と同じ微生物を腸内に定着させることによりそれ以降に摂取したサルモネラを排除することができる(Nature 1973 241 210)。最近ではより簡便に乳酸菌を初めとする既知の有用微生物を用いた生菌剤を投与して、それら有用細菌が腸内へ定着して有害細菌の定着を阻害する、あるいは腸内のpHを低下させたり有害細菌に対して抗菌作用のある物質を出すことで有害細菌の繁殖を防ぎ、腸内細菌叢を改善する方法が開発されているが、生菌を用いるため保管時の温度等の管理が難しく、安定した効果を得られない。

【0005】近年、マンノースなどの糖類がサルモネラの腸管上皮細胞への定着を阻害する効果が報告された(Poultry Science 1989 68 1357)。サルモネラや大腸菌など有害な腸内細菌のいくつかは、腸管上皮細胞のマンノース残基に結合して定着することが知られており、マンノースの投与により有害腸内細菌の腸管上皮細胞への付着を防ぎ、速やかに体外に排出することができる。生菌剤や抗生物質に比べ扱いやすく、安全性も高いので、有害細菌の排除に有効であろうと期待されている。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】マンノースは安全性、扱い易さの点で優れているが高価であり、また、独特の苦みを有するため家畜あるいは家禽の嗜好性に合わないという問題があった。その問題を解決するため植物由来のマンナンを分解したオリゴマンノースが開発されているが、サルモネラなど有害細菌の排除効果はほとんどない(鶏病研究報告1995 31 113)。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる課題を解決するために鋭意研究した結果、微生物に由来するマンナンがマンノースと同等の効果を示すこと、苦みもなく嗜好性も良好なことを見だし、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、健康な家畜を育て、かつ、食中毒菌に汚染されていない安全な畜産物を得るため、微生物由来のマンナンあるいは酵母細胞壁を摂取させる有害な腸内細菌を選択的に体外に排出させる方法及び該作用を有する飼料を提供するものである。なお本発明において、有害な腸内細菌とは、サルモネラ、大腸菌、キャンピロバクターなどの食中毒原因菌をいう。

【0008】本発明に使用されるマンナン及び細胞壁は、微生物由来のものであれば特に限定されないが、生産性や価格の点から酵母由来のものが望ましい。細胞壁のまま用いても十分にその効果を示すが、細胞壁溶解酵素により細胞壁中のグルカンを取り除き、マンナンの含量を高めたものであればマンノースとほぼ同等の、さらに、精製した微生物マンナンを用いればマンノース以上の効果を示す。

【0009】本発明に使用される細胞壁は、例えば、微生物を弱酸性水溶液に懸濁し加熱することによりエキスを除去することにより、マンナンを10%以上含むものとして容易に製造される。またマンナンは、細胞壁に細胞壁溶解酵素（グルカナーゼ）を作用させて、グルカンを除くことにより約20%のマンナンを含む粗精製物として、あるいは、細胞壁を熱アルカリに溶かして不溶物を取り除き、可溶画分を冷却して生じた沈澱を、例えばエタノール等で洗浄することにより、分子量200万程度の精製物として容易に製造することができる。

【0010】本発明の方法は、微生物由来のマンナンあるいは細胞壁を、家畜あるいは家禽に摂取させるが、摂取させる方法はいつでもかまわないが、特に、マンナンあるいは細胞壁を含有した飼料として摂取させることが好ましい。

【0011】本発明の飼料は、それぞれの家畜あるいは家禽に応じて与えられる通常の飼料に、マンナンあるいは細胞壁を0.001から10重量%の範囲で配合したものである。マンナンあるいは細胞壁の含量が0.001重量%以下では効果がなく、また10重量%を越えて配合しても、それに対応した効果は認められない。また、マンナンあるいは細胞壁を1%以上加える場合には、飼料の成分構成が変わるため家畜・家禽の重量増加、肉質、肥育期間等に影響を与えるおそれがあるため、家畜あるいは家禽によっては飼料の組成を変更しなければならないことがある。そのため1%以下の配合が望ましい。

【0012】本発明の飼料は、飼育を開始するときから常に与えておくことが望ましい。0.001重量%以上のマンナンあるいは細胞壁を添加した飼料を常に与えておけば、 $10^2 \sim 10^3$  個程度の有害細菌であれば速やかに腸内より排出させることができ、また、0.5重量%以上を添加した飼料を常に与えておけば、 $10^7$  個という大過剰の有害細菌を経口投与した場合でも非常に速やかに腸内より排出することができる。特に、腸内細菌叢のできていない生後間もない頃には多めに添加した飼料を与えた方が効果が高い。更に、病気やストレスなどにより、有害細菌が腸内で繁殖しそうだと思われるときに一時的に与えてもよい。この場合、多めに与えることにより速やかに有害細菌を排除することができる。

【0013】本発明の特徴は、微生物由来のマンナンを使用する点にある。従来利用されている植物由来のマンナンは $\beta$ 1-4結合を有する直鎖の多糖類であるが、微生物由来のマンナンは、 $\alpha$ 1-6結合の主鎖に $\alpha$ 1-3結合や $\alpha$ 1-2結合で分岐した側鎖を多数持つ多糖類である。この構造および難分解性で微生物に資化されにくいことがマンノース以上の効果を示すものと、本発明者は推察している。また、マンナンを酵素や酸で分解したのも、マンノース以上の効果を示すが、分子量1万以下にまで分解するとマンノースと同等あるいはそれ以

下の効果となる。これは側鎖が切断された結果、マンノースに比べ構造上の優位性がなくなったためと推察される。

【0014】本発明にしたがって、マンナンあるいは細胞壁を摂取させる家畜としては、豚、牛、馬、山羊、羊など、家禽としては鶏などの鳥類を挙げることができ、中でも特に鶏が望ましい。

#### 【0015】

【実施例】以下、実施例をあげて、本発明を詳細に説明する。なお、実験動物として採卵鶏の初生雄びなを用い、1群を10羽とし、30cm×38cm×18cmの大きさのケージ2つに分けて32℃で飼育した。飼料、水は自由摂取とした。飼料は試験用飼料（商品名SD幼すう用：日本配合飼料株式会社）を用いた。フン便中の各菌数測定は、フン便約0.5gを0.85%食塩水10mlに懸濁し、さらに同食塩水で適宜希釈し、その0.1mlを寒天培地上に滴下して、コンラージ棒で寒天面に広げ、37℃24時間保ったのちコロニー数を測定することにより行った。サルモネラはMLCB寒天培地（ニッスイ）を用いて培地上に黒色のコロニーのあるプレート数により陽性率を求めた。大腸菌はDHL寒天培地（ニッスイ）を用いて培地上の赤色コロニー数を測定した。試験に用いたサルモネラは *Salmonella enteritidis* であり、培養はペプトン（DIFCO）1%、酵母エキス（DIFCO）0.5%、食塩0.5%、グルコース0.1%の培地で37℃、24時間行った。

#### 【0016】製造例

*Candida utilis* IAM4264 をグルコース3.0%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%の組成からなる培地（pH4）で24時間培養し、集洗菌後に適量の0.01N硫酸溶液に懸濁し、沸騰水中で5分加熱して、冷却後5000rpm、5分間遠心分離した残さを凍結乾燥することにより、マンナンを10%含有した酵母細胞壁を得た。この酵母細胞壁の一部を蒸留水にとかし10%溶液とし、酵母細胞壁の0.5重量%のグルカナーゼ（天野製薬）を加えて細胞壁のグルカンを分離し、マンナンを20%含有した酵母細胞壁酵素処理物を得た。また、酵母細胞壁の一部を3%水酸化ナトリウム溶液に懸濁し、70℃、4時間保った後、10000rpm、10分間遠心分離して不溶物を取り除き、硫酸にてpH7に中和して10℃で一晩放置後、生じた沈澱を10000rpm、10分間遠心して分離し、得た沈澱に適量のエタノールを加えてエタノール可溶物を除去することにより酵母マンナンを得た。酵母マンナンは、純度（4N硫酸で分解し、生じたマンノースより算出した。）90%以上、粗タンパク2%以下、分子量200万であった。

#### 【0017】実施例1

以下の6群で行った。

1. コントロール（マンナン・マンノース非投与）

## 2. マンノース添加区

## 3. 製造例で得た酵母細胞壁添加区

## 4. 製造例で得た酵母細胞壁酵素処理物添加区

## 5. 製造例で得た酵母マンナン添加区

## 6. グアーガム（植物マンナン）添加区

2、4、5、6は各試料をそれぞれ0.1%、3は試料を1%になるように添加した飼料を与えた。餌付け開始翌日（餌付け開始時が0日目）から3日間続けてサルモネラ培養液（ $10^8$  個/ml）を0.1ml/日ずつ経口投与し、強制的にサルモネラに感染させた後、週2回、各区20個ずつフンを採取しフン便中のサルモネラ、大腸菌を測定した。サルモネラ陽性率を図1に、大腸菌数の推移を図2に示す。

【0018】

【図1】

【0019】

【図2】

【0020】コントロール区はサルモネラ投与後試験終了（24日目）までフン便のサルモネラ陽性率は80%以上と高かったが、マンノース区ではサルモネラ投与開始後17日目にはフン便中にサルモネラが検出されなくなった。酵母細胞壁添加区は試験終了時にも1検体のみに検出されただけであった。細胞壁の酵素処理物は細胞壁よりも高い効果を示し、マンノースとほぼ同等の効果で、マンノースにやや遅れて21日目に検出不能となった。これはマンナン濃度が高くなったためだけでなく、

細胞壁からグルカンが取り除かれたためマンナンがサルモネラに吸着しやすくなったためと考えられる。さらに、精製された酵母マンナンは最も高い効果を示し、マンノースより早く14日目には陽性率0%となった。細胞壁に比べ余分なものが無くなっただけでなく、その構造が効果を高めていると思われる。一方、植物由来のマンナンでは効果が非常に低く、試験終了時も陽性率は60%以上あった。フン便中の大腸菌数はマンノース区、酵母細胞壁区、マンナン区いずれもコントロールに比べ少なく、腸内への定着と腸内での繁殖が抑制されたと推察された。これに対し、植物マンナンを与えた区では一時的に大腸菌数が増加する現象がみられたが、最終的にはコントロール区以下にまで低下した。

【0021】実施例2

製造例で得た酵母細胞壁の酵素処理物、酵母マンナン、及びマンノースをそれぞれ0、0.001、0.01、0.05、0.1、1、10%含む飼料を調整し、飼育を行った。餌付け開始翌日（1日目）から3日間連続でサルモネラの培養液をサルモネラ菌数が $10^2 \sim 10^3$  個/mlとなるように飲水に混ぜて投与した。餌付け開始後24日目に鶏を解剖し、盲腸を無菌的に取り出し、盲腸便中のサルモネラの有無を調べた。各試料を10%含む飼料を与えた場合の試験終了時の体重を表1に、濃度と陽性率との関係を図3に示す。

【0022】

【表1】

試料	コントロール	マンノース	細胞壁処理物	酵母マンナン
終了時の体重	195g	144g	218g	204g

【0023】

【図3】

【0024】その結果、0.001%という低濃度でも酵母マンナン精製物は非常に強い効果を示し、試験終了時の陽性率は10%であった。酵母細胞壁の酵素処理物はマンノースより効果が弱かったが、陽性率は40%以下にまで下がっていた。高濃度ではマンノース区では苦みのためか飼料の消費量が著しく低下し生育が遅れたが、他の区では順調であった。

【0025】実施例3

製造例で得た酵母マンナンを酵素マンナーゼで分解し、ゲル濾過にて分子量数十万程度のものと1万以下のものを調整した。また、4N硫酸で酵母マンナンを加水分解し水酸化カルシウムで中和して沈殿物を取り除いてマンノースが1～数分子のオリゴ糖を調整した。これらの多糖およびマンノース、酵母マンナンを0.1%配合した飼料を用いて実施例1と同様の試験を行った。図4に示すように、分子量1万以下にまで分解するとマンノースよりも効果が下がったが、オリゴ糖程度にまで分解

するとマンノースとほぼ同等の効果であった。以上のことより、サルモネラ排除機構には酵母マンナンの立体構造が大きく関わっていると推察される。

【0026】

【図4】

【0027】

【発明の効果】以上説明してきたように、本発明によると、家畜あるいは家禽の食欲を阻害することなく、食中毒の原因となる有害な腸内細菌を選択的に体外に排除する方法及び該作用を有する飼料が提供される。

【図面の簡単な説明】

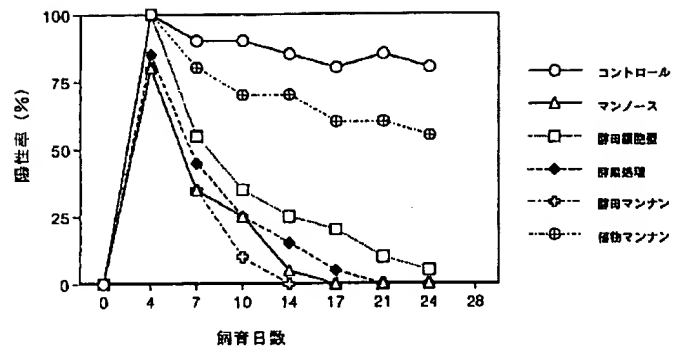
【図1】飼育日数とサルモネラ陽性率との関係を示す図である。

【図2】飼育日数とフン便中の大腸菌数との関係を示す図である。

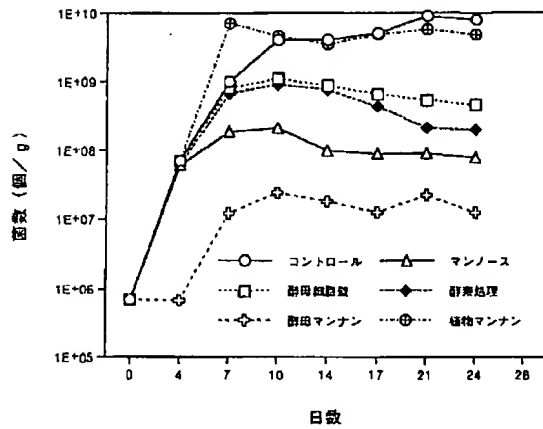
【図3】試料濃度とサルモネラ陽性率との関係を示す図である。

【図4】マンナンの分子量と、サルモネラ陽性率との関係を示す図である。

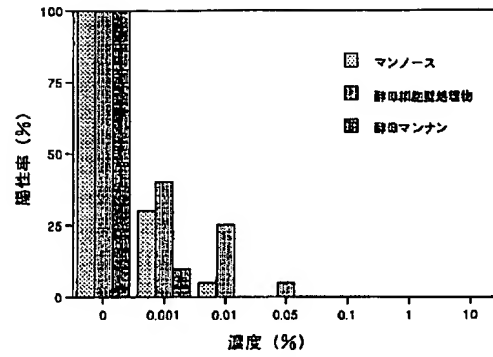
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

